



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
HIDROGELES PARA LA LIBERACIÓN
SOSTENIDA DE FÁRMACOS**

Autor: Carmen González Rubiales

Fecha: Febrero 2019

Tutor: Paloma M. de la Torre Iglesias

ÍNDICE:

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	3
3. OBJETIVOS	6
4. METODOLOGÍA	6
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
5.1. Anatomía ósea	6
5.2. Tratamiento de enfermedades óseas	7
5.3 Ingeniería de tejido óseo.....	8
5.4 Uso de hidrogeles para la regeneración ósea.....	9
5.4.1 Requisitos:	9
5.4.2 Clasificación:	9
5.4.3 Hidrogeles para el transporte de células madre y factores de crecimiento.....	11
5.5 Hidrogeles de quitosano y beta-glicerofosfato (β -GP).....	11
5.5.1 Adición de colágeno	13
5.5.2 Cerámica	13
5.5.3 Modificación del quitosano	14
5.5.4 Enriquecimiento con componentes bioactivos	15
5.5.5 Aplicaciones en la administración de fármacos, moléculas bioactivas y células	15
5.6 Hidrogeles de alginato con poliaminoamida	17
6. CONCLUSIÓN	19
7. BIBLIOGRAFÍA	19

1. RESUMEN

En la actualidad se están investigando y desarrollando múltiples tipos de hidrogeles en el campo de la biomedicina, para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, la diabetes y las enfermedades degenerativas óseas. Este trabajo se ha centrado en este último caso, pues suponen un importante avance frente a las terapias tradicionales. Se han estudiado sus propiedades en función de los polímeros de los que se parte, los materiales con los que se combinan y las modificaciones que se realizan. Los resultados sobre sus propiedades mecánicas, biocompatibilidad y velocidad de degradación, entre otros, indican que si bien son una vía prometedora de investigación, hay que continuar realizando experimentos y buscando alternativas que reúnan las mejores cualidades para el tratamiento de las enfermedades óseas.

2. INTRODUCCIÓN

Los hidrogeles son redes tridimensionales de polímeros unidos por enlaces cruzados con una gran capacidad para retener agua u otros fluidos biológicos en su interior. Sus múltiples cualidades como hincharse en medio acuoso y responder a estímulos como el pH o la temperatura han hecho que sean objeto de estudio y en los últimos años se hayan desarrollado diversos tipos de hidrogeles. ^[1]

Los polímeros pueden ser hidrofílicos o hidrofóbicos. Los primeros favorecen que el hidrogel se hinche, mientras que los componentes hidrofóbicos controlan el rango de hinchamiento y las propiedades mecánicas del mismo. Los polímeros hidrofílicos suelen tener grupos ionizables, tanto ácidos como básicos unidos a sus cadenas y se pueden disociar. La cantidad de agua que pueden retener depende del balance osmótico y de la fuerza elástica de recuperación. Generalmente, la estructura de un hidrogel está formada por una columna de monómeros, enlaces cruzados, comonómeros electrolíticos, y un solvente. El uso de polímeros tanto naturales como sintéticos puede contribuir a la formación de un hidrogel. Se pueden clasificar en función de diversos criterios como la ruta mediante la que se hayan sintetizado, la carga iónica, su estructura física, tamaño, tipo de enlaces y según sus características mecánicas y estructurales. ^[1]

Se pueden sintetizar por diversas técnicas. Las técnicas convencionales de polimerización de radicales permiten crear hidrogeles con distintas composiciones, tamaños y morfologías. El uso de iniciadores o macroiniciadores hace posible que haya grupos funcionales en el interior o en la superficie del hidrogel y se mejora, por tanto, la bioconjugación multivalente. Para la síntesis se utilizan enlaces cruzados físicos o métodos químicos. Los métodos físicos crean gran variedad de tipos de geles reversibles de forma fácil, mediante la selección de hidrocoloides, concentración y pH. En la síntesis química se recurre a la creación de enlaces covalentes entre las cadenas de polímeros. Normalmente se emplean reacciones heterogéneas de polimerización en presencia de enlaces cruzados bi- o multifuncionales. ^[1]

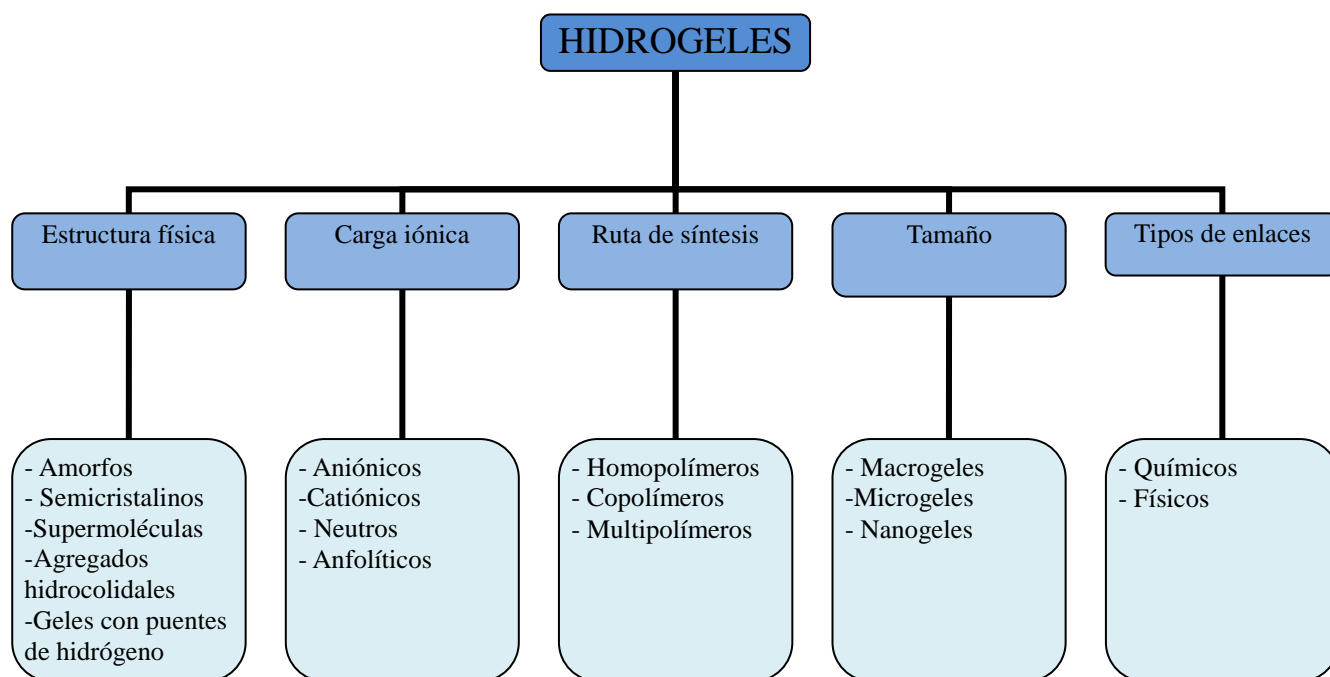


Fig 1. Tipos de hidrogeles^[1]

Los hidrogeles responden a gran cantidad de estímulos que causan un aumento o descenso de su volumen. La velocidad de esta expansión o contracción varía según el tipo de estímulo, siendo muy rápido con estímulos eléctricos, pero llegando a tardar horas cuando se exponen a luz visible.

Los hidrogeles pueden llegar a absorber cantidades de agua o fluidos cientos o miles de veces mayores que su propio peso. Los estímulos a los que responden están condicionados por la funcionalidad de los monómeros que los forman, así como por el balance entre moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas.^[1]

Según a los estímulos a los que responden se pueden clasificar en:

Sensibles a pH: cambian de volumen como respuesta al pH del medio que les rodea. Suelen tener grupos ionizables ácidos y básicos que pueden protonarse o liberar protones cuando hay cambios en el pH. Ante una modificación del pH se produce una diferencia de gradiente entre el hidrogel y el medio que lo rodea. Hay una entrada o salida de iones en el hidrogel y cambia la presión osmótica de su superficie que provoca un cambio de volumen. Se alcanza el equilibrio en el gel gracias a las fuerzas elásticas de recuperación que equilibran la presión osmótica.^[1]

Sensibles a la temperatura: contienen tanto grupos hidrofílicos como hidrofóbicos. Presentan cambios de volumen tanto a la mínima temperatura crítica de la solución (LCST) como a la máxima temperatura crítica de solución (UCST). Se pueden dividir en tres grupos siendo sensibles a temperaturas negativas, sensibles a temperaturas positivas o térmicamente reversibles. Este tipo de geles se usa en la liberación retardada de fármacos. Los hidrogeles más usados de este grupo están basados en la N-isopropilacrilamida, que cambian de volumen a una temperatura de 33°C. Al

producirse una reducción del volumen se libera el fármaco que contiene. Los geles de polímeros de N-isopropilacrilamida han sido muy estudiados dado que tienen una LCST próxima a la temperatura corporal. Cuando aumenta la temperatura los puentes de hidrógeno se vuelven más débiles mientras que las interacciones hidrofóbicas se hacen más fuertes. Todo esto provoca la contracción del hidrogel. [1]

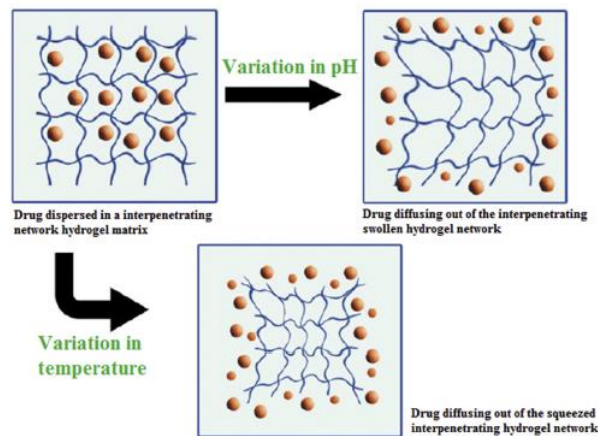


Fig 2. Liberación de fármacos por variaciones en pH y temperatura [1]

Sensibles a luz: se dividen en sensibles a luz ultravioleta (UV) y los sensibles a luz visible. Se usan moléculas que al ser ionizadas por la luz UV producen un aumento de presión osmótica y con ello el hinchamiento del gel. Los hidrogeles sensibles a la luz visible contienen cromóforos, partes de moléculas que pueden absorber y después emitir luz provocando un aumento de temperatura. En estos casos la liberación del contenido del hidrogel se produce de manera similar a la de los hidrogeles sensibles a la temperatura. [1]

Sensibles a estímulos eléctricos: su mecanismo es parecido a los hidrogeles sensibles a variaciones en el pH. La diferencia radica en que, en este caso, hay un movimiento de iones a través del hidrogel para regular el gradiente de concentración iónica entre el hidrogel y el solvente producido por el campo eléctrico. Así, se produce el hinchamiento o contracción del hidrogel. Dado que se ha visto que el solvente entra por una zona y sale por otra, se produce una deformación del hidrogel que conlleva una distribución desigual de la concentración iónica y del pH. [1]

Sensibles a estímulos mecánicos: para la síntesis de este tipo de hidrogeles se usan tensoactivos, es decir, sustancias que modifican la tensión superficial entre dos fases distintas para favorecer su estabilidad. La agregación se produce por fuerzas de van der Waals entre los grupos hidrofóbicos y se forman las micelas que forman los bloques que constituyen el hidrogel. [1]

Sensibles a enzimas: las reacciones enzimáticas tienen una elevada especificidad en cuanto al sustrato y requieren un medio más moderado que otras reacciones químicas, por lo que son adecuadas para su uso en medicina. El paso de solución a gel y viceversa se consigue mediante la

catálisis enzimática de los procesos de síntesis o hidrólisis. Se están estudiando en concreto los hidrogeles que responden a la actividad de la proteasa y la glicosidasa. ^[1]

Los hidrogeles se usan en muchos campos, sistemas de liberación de fármacos, agricultura, ingeniería de tejidos, curación de heridas, industria alimentaria y productos higiénicos entre otros.

3. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es analizar los distintos tipos de hidrogeles y sus características generales, así como sus aplicaciones, centrándose en la regeneración ósea como tratamiento de defectos a nivel de los huesos. Para entender correctamente la acción de los hidrogeles en este tipo de patologías, se ha añadido una breve introducción sobre la anatomía ósea.

4. METODOLOGÍA

Se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica sobre las generalidades y usos de los hidrogeles y su aplicación en el caso concreto de la regeneración ósea. Se han usado bases de datos online como PubMed y Sciencedirect. Para el acceso a determinados artículos y publicaciones se ha utilizado la base de datos online de la Biblioteca de la Universidad Complutense.

Palabras clave: hydrogels, bone regeneration, mesenchimal stem cell, chitosan, glycerol-phosphate, alginate.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Anatomía ósea

Los huesos son tejido conectivo vascularizado que proporciona soporte al cuerpo. Están formados por hueso cortical o denso y hueso trabecular o esponjoso. ^[2]

El hueso denso está formado por osteones que son la repetición de unidades de micrones, mientras que el hueso poroso tiene múltiples cavidades donde se encuentra la médula ósea. Los osteones están formados por nanofibras concéntricas de colágeno que rodean el canal central. En torno a las fibras de colágeno hay cristales de fosfato cálcico. En cuanto a la matriz extracelular, dos tercios son materia inorgánica y un tercio materia orgánica, mayoritariamente fibras de colágeno tipo 1. Hay tres tipos de células óseas, osteocitos, osteoblastos y osteoclastos, que trabajan de forma continua. Los osteoblastos son las células principales encargadas de la formación de hueso cubren la superficie de los huesos formando una matriz constituida por cadenas de colágeno polimerizadas. Esta matriz u osteoide se mineraliza mediante el depósito de fosfato y calcio. Los osteoblastos producen, además hormonas que favorecen la formación ósea. Los osteocitos conectan con los osteoblastos y otras células interviniendo en el proceso de homeostasis mineral. Por último, los osteoclastos se encargan de la resorción ósea. La acción combinada de estas células mantiene la masa ósea y ayuda a la remodelación de los huesos. ^[2]

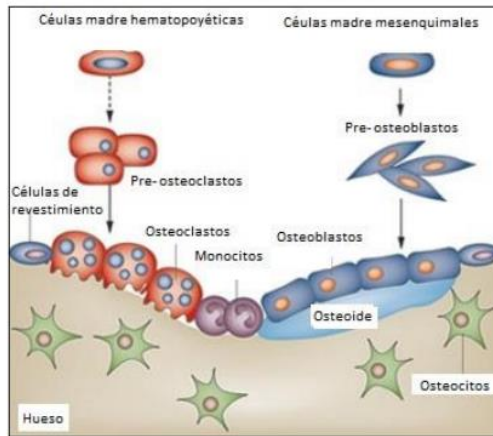


Fig 3. Ciclo de remodelado óseo^[3]

Para que se pueda producir la regeneración ósea como es debido, es necesaria la presencia de células madre mesenquimales (MSC) que dan lugar a diversos tipos celulares como son osteocitos, condrocitos y adipocitos. También tienen efecto inmunosupresor ya que secretan citoquinas en focos inflamatorios.^[3]

El daño óseo puede producirse por diferentes causas como fracturas, la edad, infecciones, cáncer o defectos congénitos. Uno de los defectos óseos más común es la osteoporosis. Consiste en una pérdida de masa ósea y deterioro de la estructura del hueso que provoca mayor fragilidad ósea y mayor riesgo de fracturas. Es más habitual en mujeres, en concreto tras la menopausia, ya que hay menores niveles de estrógenos. También se relaciona con un déficit de vitamina D, el alcohol, el tabaco o una baja actividad física. Las alteraciones estructurales se pueden observar en la siguiente imagen.^[3]

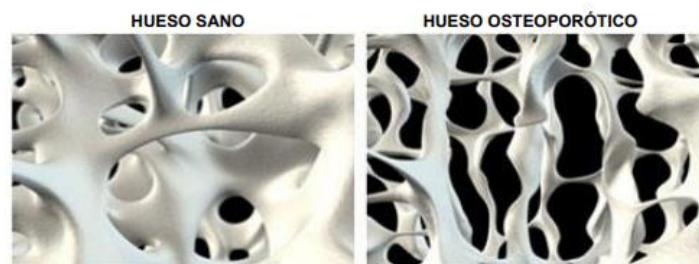


Fig 4. Alteraciones estructurales óseas^[3]
American College of Rheumatology

Cuando se producen defectos óseos que superan la capacidad de autorregeneración del hueso, es necesario intervenir para favorecer la regeneración y restablecer la función normal.

5.2. Tratamiento de enfermedades óseas

La terapia actual de las fracturas óseas se basa en colocar el hueso en posición correcta y asegurarlo mediante prótesis metálicas para favorecer su curación. El material de los implantes influye en el proceso de regeneración. Aunque los implantes metálicos han demostrado mucha efectividad en el

tratamiento de defectos óseos en huesos como el fémur, no se integran completamente en los tejidos circundantes. Se han desarrollado implantes de fosfato cálcico, ya que al ser un material bioactivo y que induce la actividad ósea, facilita la curación de las lesiones y se integra más fácilmente en el tejido. A pesar de que soluciona parte de los inconvenientes de los implantes metálicos tradicionales, presenta poca fuerza mecánica, baja solubilidad en agua y un ratio de biodegradación variable por lo que su uso se limita a lesiones en huesos que soporten poco peso. [2]

Si bien se han estudiado múltiples materiales para el desarrollo de implantes, la cirugía no cumple en muchos casos algunos de los parámetros más importantes como son la viabilidad del tejido implantado o la fisiología nerviosa. Por ello, se recurre a procedimientos alternativos como son los hidrogeles, un tipo de andamios de polímeros. [2]

5.3 Ingeniería de tejido óseo

Combina el uso de células y biomateriales para reemplazar el tejido dañado por tejido funcionalmente activo. Se usan matrices tridimensionales que imiten la arquitectura ósea y aporte un soporte estructural en la zona dañada. En la elección de células para este fin se suelen elegir células madre mesenquimales. [4]

Como se ha explicado con anterioridad, estas células están implicadas en el proceso de regeneración ósea. Se pueden aislar de distintos tejidos y se pueden realizar tanto trasplantes autólogos como alogénicos. Estos segundos conllevan cierto riesgo de producir rechazo inmunológico. Por ello, se suele recurrir a los autoinjertos óseos aunque presentan desventajas como el acceso limitado a las fuentes de extracción, la duración prolongada de los procedimientos quirúrgicos, etc. [3]

Hoy en día, se combinan este tipo de células con materiales de soporte como los hidrogeles. Pudiendo además, añadir un tratamiento farmacológico para tener un mayor control sobre la diferenciación celular y la respuesta inflamatoria. [3]

Es importante definir algunas características relacionadas con los soportes o biomateriales utilizados:

- Osteoconducción: capacidad para guiar el crecimiento de células progenitoras óseas y vasos sanguíneos. Es necesario que el biomaterial puede acoger en su superficie a los osteoblastos y facilitar su proliferación. Es necesaria cierta porosidad para que se puedan formar los vasos sanguíneos que irrigen el tejido. [3]
- Osteoinducción: estimulación y reclutamiento de células mesenquimales para que den lugar a osteoblastos. Permite crear hueso en una zona donde previamente no lo había. Para este fin se suelen usar factores de crecimiento. [3]

Estos soportes o andamios que se implantan en el cuerpo humano deben mantener su fuerza y estabilidad durante el periodo de degradación y posterior reemplazamiento por tejido del huésped,

coordinar su tasa de resorción con la velocidad de reparación del propio organismo y presentar cierta porosidad que permita el transporte de oxígeno, nutrientes y desechos. [5]

No solo se busca crear un microambiente que favorezca la adhesión, proliferación y diferenciación celular, sino también rellenar el hueso y proporcionar una competencia mecánica mientras la lesión va siendo reparada. [6]

5.4 Uso de hidrogeles para la regeneración ósea

Los hidrogeles se están usando ampliamente en el tratamiento de enfermedades óseas para el transporte de fármacos y células. Crean un ambiente hidrofílico óptimo para la supervivencia celular y el crecimiento óseo. Además, pueden diseñarse hidrogeles con la geometría necesaria según la administración que se desee darles. [2]

5.4.1 Requisitos:

Para poder considerarse aptos para su uso tienen que reunir una serie de características:

- No ser citotóxicos ni causar respuesta inmunitaria
- Osteocompatibilidad
- Imitar lo mejor posible la matriz extracelular para que se integren mejor
- Ser degradables por enzimas biológicas para poder dejar sitio para hueso de nueva síntesis
- Estabilidad estructural y fuerza mecánica
- Tamaño de poro y porosidad adecuados
- Inyectabilidad para facilitar la administración y reducir molestias al paciente. A diferencia de las prótesis, no necesitan ser implantados mediante cirugía. [2]

5.4.2 Clasificación:

5.4.2.1 Según su origen:

- Naturales: se sintetizan a partir de materiales naturales como proteínas (fibrina, colágeno y gelatina) y polisacáridos (chitosan, ácido hialurónico y alginato). Estos materiales suelen ser parte de la matriz extracelular o muy similares a la misma, por lo que tienen buena biocompatibilidad y baja respuesta inflamatoria. Se degradan metabólicamente o por degradación enzimática. El mayor problema de los hidrogeles de origen natural es que tienen poca fuerza mecánica y sólo son adecuados en huesos que tienen que soportar poco peso. Al modificar química o físicamente los grupos funcionales de los polímeros se pueden mejorar sus características. Los hidrogeles formados por procedimientos físicos tienen la ventaja de ser fácilmente sintetizables

y no presentar ninguna toxicidad, a diferencia de los métodos químicos donde se crean enlaces covalentes.^[2]

- Sintéticos: a partir de polímeros biodegradables como el polietilenglicol, polivinilalcohol o poliacrilamida. Se componen de unidades estructurales básicas que permiten ajustar sus características en función de la aplicación que se les vaya a dar. Se están estudiando para el transporte de factores de crecimiento, proteínas y fármacos. Se caracterizan por tiempos de vida útil largos, rigidez mecánica y tasa de degradación regulable. Las características de los polímeros influyen en la estructura y propiedades del hidrogel que se forme. Se pueden combinar con compuestos químicos y biológicos que mejoren su baja actividad biológica y otros defectos típicos de este tipo de hidrogeles.^[2]

5.4.2.2 Según su estructura:

- Microperlas: las microperlas pueden ser producidas por diversos métodos. Mientras que los métodos tradicionales no daban lugar microperlas de un tamaño pequeño y uniforme, recientemente se ha desarrollado una técnica de desequilibrio de microfluidos. La técnica consiste en inyectar los polímeros en una interfaz agua/aceite (W/O) no equilibrada que contiene moléculas precursoras del hidrogel en las gotas de agua. Al inyectarse los polímeros las gotas de agua se encojen y condensan dando lugar a microperlas de un tamaño menor a 100mm. La forma y tamaño de las microperlas se puede cambiar controlando el grado de contracción de las gotas de agua y el agente enlazante. Estos hidrogeles presentan una elevada superficie y mayor capacidad de transferencia, lo que favorece la liberación de fármacos y células madre.^[2]
- Nanopartículas: son redes esféricas tridimensionales de polímeros formadas por cruzamiento físico o químico que se hinchan en agua. Sus principales propiedades son buena biocompatibilidad y buenas propiedades mecánicas. El hecho de que tengan un tamaño adaptable, sean uniformes, fáciles de diseñar y fabricar y tengan una gran superficie, capacidad de retener grandes cantidades de fármacos y estabilidad, las hace una buena opción para el transporte de fármacos y proteínas.^[2]
- Fibras: son estructuras fibrosas con radios que van desde algunos nanómetros hasta micras. Su producción consta de dos pasos, el hilado y el entrecruzamiento. Entre los múltiples tipos de hilado, los más estudiados son el electrospinning y el hilado microfluídico. Posteriormente se exponen a diversos factores como el calor, UV, glutaraldehído o enzimas para formar el hidrogel. Se inyectan en el sitio de la lesión

y permanecen allí más tiempo que las microperlas. Además, dada su alta relación superficie-volumen y su respuesta rápida, han demostrado ser adecuados para ingeniería de tejidos. Presentan algunas desventajas, baja fuerza mecánica y elevado hinchamiento, que se están intentando corregir mediante diferentes modificaciones llevadas a cabo en múltiples estudios para conseguir una liberación controlada. [2]

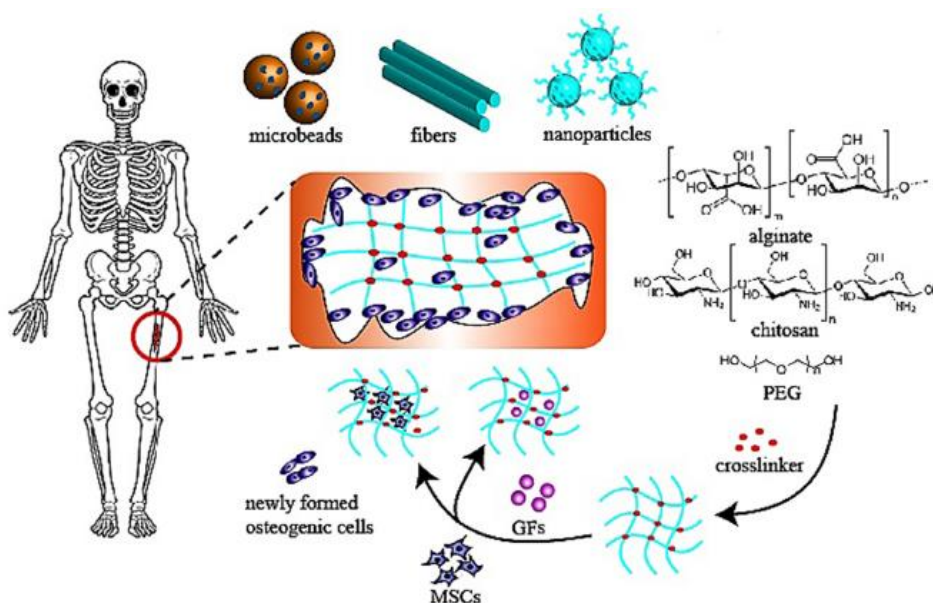


Fig 5. Explicación sistemática del uso de hidrogeles en la regeneración ósea [2]

5.4.3 Hidrogeles para el transporte de células madre y factores de crecimiento

Las moléculas transportadas en el interior de los hidrogeles mantienen sus propiedades durante más tiempo hasta llegar al sitio de liberación donde ejercerán su función. El uso de hidrogeles en el transporte de factores de crecimiento facilita la osteogénesis. Además, se está estudiando el transporte de células madre indiferenciadas que puedan simular el tejido óseo y favorecer a su regeneración. [2]

Se suelen usar células mesenquimales adultas aisladas del propio paciente ya que no presentan riesgo inmunitario. Actualmente se está estudiando su extracción del tejido adiposo debido a su accesibilidad y gran cantidad de MSC adultas. [7]

5.5 Hidrogeles de quitosano y beta-glicerofosfato (β -GP)

El quitosano es un polisacárido natural de estructura lineal formado por unidades de beta(1,4)-D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. Se obtiene a partir de la quitina mediante procesos de desacetilación. La quitina se extrae de los exoesqueletos de crustáceos y es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. [8] El quitosano presenta una elevada biocompatibilidad y tiene actividad antimicrobiológica. Dado que no es sensible a cambios de temperatura, la gelificación se consigue añadiendo beta-glicerofosfato. A un pKa por debajo de 6,2 se neutraliza la solución de quitosano por protonación de los grupos amino y se produce la formación de un precipitado con aspecto de gel. Para formar el hidrogel hay que trabajar a pH

mayores de 6, generalmente en un rango entre 6,8 y 7,2 y manteniendo la temperatura ambiente. Al añadir sales de beta-glicerofosfato se forma un líquido gelatinoso que conforme aumenta la temperatura aumenta su viscosidad hasta transformarse en un gel propiamente dicho al alcanzar la temperatura corporal. Mediante la adición de beta-glicerofosfato se consiguen tres puntos muy importantes: aumentar el pH del gel hasta el pH fisiológico (7,0-7,4), impedir la precipitación inmediata del gel y conseguir la gelificación a 37°C. Se forman enlaces entre los grupos fosfatos del beta-glicerofosfato y los amino del quitosano y debido a la acción del agua y del glicerol se crean interacciones hidrofóbicas entre las cadenas de quitosano. Estas interacciones hidrofóbicas son las que condicionan la dependencia de temperatura. Mientras que a baja temperatura las cadenas de quitosano interaccionan con el agua, al calentarse se cambian las moléculas de agua por glicerol y se forma el gel. Un aumento de temperatura limita la disposición de las moléculas de agua y reduce la cantidad de enlaces de hidrógeno favoreciéndose la gelificación. [9]

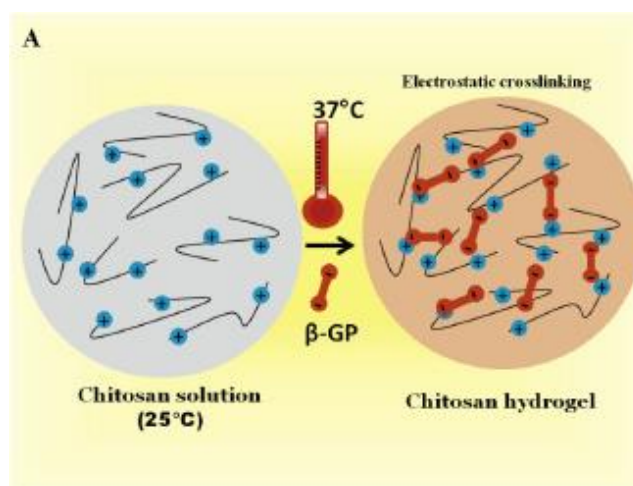


Fig 6. Gelificación de una solución de quitosano en presencia de β -glicerofosfato. La solución es líquida a temperatura ambiente pero gelifica a temperatura corporal. [10]

Estos geles han demostrado una alta eficiencia en el transporte de un amplio rango de moléculas, principios activos y factores de crecimiento.

Debido a su gran similitud con los glucosaminoglucanos (GAGs) se emplean en la regeneración de cartílago y hueso. Se ha demostrado en múltiples estudios el potencial curativo del quitosano al actuar sobre células inflamatorias (neutrófilos, células endoteliales, fibroblastos y macrófagos). A parte de las propiedades del quitosano, el beta-glicerofosfato en sí mismo forma parte de los componentes del medio osteogénico, ya que favorece el paso de células madre mesenquimales a osteoblastos. Los polímeros de quitosano son fácilmente degradables por hidrólisis por lisozimas. Los monómeros resultantes no son tóxicos y se incorporan en rutas metabólicas. El quitosano puede usarse en distintas formas, ya sea en forma de hidrogel, film, esponjas porosas o fibras. Los hidrogeles destacan por facilitar la adherencia de células, mayoritariamente osteoblastos frente a fibroblastos. [9]

Cuando el daño se encuentra en huesos que deben soportar carga se usan en combinación con partículas cerámicas, mientras que si es una zona que no soporta un gran peso se pueden usar solos. Para regeneración ósea es favorable que el hidrogel tenga un tiempo de gelificación relativamente corto, que sea estable al pH sanguíneo y se degrade de forma controlada. Tanto el tiempo de gelificación como el tiempo de degradación se puede modificar en función de la concentración de β -GP. Cuanto mayor es la concentración, menor es el tiempo de degradación pero pueden aparecer problemas de toxicidad. Como alternativa, se puede añadir NaHCO_3 para reducir ese tiempo, teniendo en cuenta que un uso elevado de agentes gelificantes puede provocar la muerte celular. Por lo tanto, es necesario alcanzar un equilibrio entre todos los componentes para conseguir una velocidad de gelificación óptima sin dar problemas de toxicidad.^[9]

Los hidrogeles de CS/ β -GP pueden ser modificados para mejorar sus propiedades. Según el procedimiento que se realice o el material que se añada se consigue un efecto u otro.^[9]

5.5.1 Adición de colágeno

Se consigue una mejora en la adhesión, proliferación y diferenciación celular con la inclusión del colágeno. El colágeno ácido soluble (ASC) refuerza la estructura del hidrogel de CS/ β -GP y crea un ambiente similar al del propio hueso. El colágeno de tipo 1 forma parte de la matriz extracelular aportando estructura e interviniendo en la cascada de reacciones que da lugar a la formación de hueso.^[9]

Los hidrogeles híbridos con ASC presentan una elevada cantidad de interconexiones que facilita la formación de una estructura fibrosa con mayor estabilidad a cambios de pH, mejor compatibilidad con el medio circundante y mayor proliferación celular.^[9]

El colágeno de tipo 1 es la proteína más abundante en la matriz extracelular y se usa ampliamente en la creación biomateriales ya que promueve la adhesión y proliferación celular. Se puede extraer de la piel, tendones, cartílago, etc.^[11] Se ha visto que su combinación con los hidrogeles de CS/ β -GP mejora la distribución de células madre mesenquimales óseas y forma una matriz más compacta y con mayor biocompatibilidad. Además de mejorar la morfología del hueso formado con poros uniformes y coherentes, la adición de colágeno acelera la velocidad de degradación del hueso. A pesar de que el colágeno no es hidrosoluble, mantiene la osmolalidad del hidrogel necesaria para el crecimiento celular.^[9]

5.5.2 Cerámica

Para poder mejorar los puntos débiles del tratamiento de defectos óseos con hidrogeles, se ha estudiado la adición de una fase mineral. Se han analizado múltiples cerámicas bioabsorbibles como el fosfato tricálcico, la nanohidroxiapatita, cerámicas de nanobiocristales y la wollastonita, teniendo

todas unas cualidades parecidas para imitar la parte mineral del hueso. El uso de estos materiales permite que el hidrogel se integre mejor.^[9]

Hoy en día, se prefieren las nano cerámicas por su menor tamaño respecto a las cerámicas tradicionales.^[9] Las nano partículas de hidroxiapatita (HAP) han demostrado tener alto potencial para la diferenciación osteogénica y para promover la osteogénesis in vivo, ya que poseen una alta actividad superficial y una estructura ultrafina muy parecida a la del hueso.^[12]

El uso de quitosano nativo en la fabricación de estos hidrogeles provoca que tengan dificultad para transportar células, principios activos u otras moléculas y se usen únicamente como materiales de relleno.^[9] Sin embargo, se ha comenzado a estudiar el uso de quitosano fotoentrecruzable y nanoHAP para formar hidrogeles que podrían servir como transporte de células madre mesenquimales.^[12]

La adición de cerámicas compensa la baja osteoinducción de los hidrogeles de CS/ β -GP. Además, que éstas contengan calcio es de interés ya que es el principal componente inorgánico de la matriz ósea nativa. Gracias al depósito de apatitas que se produce con el uso de cerámicas en los hidrogeles de CS/GP se mejora enormemente la biocompatibilidad, bioactividad, conductividad ósea y la integración en el hueso.^[9]

5.5.3 Modificación del quitosano

Con el fin de mejorar las cualidades de los hidrogeles de CS/GP se puede alterar la estructura del quitosano, manteniéndose sus propiedades termosensibles. Los grupos amino pueden ser protonados usando metales, iones u otras moléculas.^[9]

Un ejemplo es el uso de complejos con zinc, que tiene un papel importante en la mineralización de los osteoblastos ya que interviene en el almacenamiento de proteínas y transportadores. Los hidrogeles que contienen zinc tienen un tiempo menor de gelificación y una capacidad reducida de hinchamiento. Esto es positivo, dado que un elevado hinchamiento provoca que el gel se separe de la zona dañada. Además, el zinc aumenta la capacidad antimicrobiana contra *E.coli* y *S.aureus* y aumenta la biocompatibilidad.^[9] Según la concentración utilizada se consiguen hidrogeles con distintas propiedades mecánicas y antibacterianas. A mayor cantidad de zinc mayor potencial antibacteriano, ya que se liberan iones de zinc cargados positivamente que se unen a la pared bacteriana que tiene carga negativa dañándola y causando su destrucción.^[13]

Otra opción es añadir un grupo tiol a los grupos amino del quitosano, que se hace así hidrosoluble. Los grupos tiol pueden formar puentes bisulfato con otras proteínas y adherirse. La hidrólisis lenta de estos enlaces y la degradación del esqueleto de CS son muy importantes en la liberación sostenida de fármacos. Estos hidrogeles presentan buena biocompatibilidad y reducida toxicidad lo que los hace aptos para el transporte de fármacos.^[9]

5.5.4 Enriquecimiento con componentes bioactivos

Cuando hay daño óseo se produce una situación de hipoxia y de estrés oxidativo que dificulta la diferenciación de los osteoblastos y promueve la resorción ósea. Se ha visto que el uso de determinadas sustancias puede mejorar estos aspectos, por ejemplo, los taninos tienen propiedades antioxidantes y antimicrobianas. ^[9]

Con la adición de ácido gálico y floroglucinol a los hidrogeles se observó una reducción irreversible en el daño producido por radicales libres. Por lo tanto, estos geles tienen propiedades antioxidantes, además de la capacidad de barrido propia del quitosano. Ésta depende del nivel de desacetilación, observándose una relación directa en el aumento de ambas. Hay múltiples formas de aumentar la actividad antioxidante: la presencia de nitrógeno en el carbono dos del quitosano, la formación de macromoléculas estables debido a la absorción de iones de hidrógeno por parte de los grupos amino de las cadenas de quitosano, los grupos hidroxilos también tienen capacidad de barrido. ^[9]

Si bien tanto los hidrogeles con floroglucinol como con ácido gálico son estables tanto en estado mineralizado como no mineralizado, los que llevan ácido gálico tienen una disminución en su actividad y una cierta toxicidad. La combinación de distintos antioxidantes puede compensar los defectos de cada uno y unir sus propiedades. ^[9]

La conductividad eléctrica es positiva en la ingeniería de tejidos ósea, dado que estimula la regeneración, aumenta los marcadores óseos y la producción de proteínas de la matriz extracelular y de factores de crecimiento. ^[9]

La adición de nanotubos de carbono produce mayor porosidad y tamaño de poro, generando más área de superficie y retención de agua. Un alto contenido en nanotubos de carbono puede provocar un gran distanciamiento entre las cadenas de quitosano e impedir el entrecruzamiento. Estudios han demostrado que una concentración del 0,5% es la idónea por su velocidad de degradación y la fuerza que tiene. ^[9]

De todos los procedimientos anteriormente descritos, añadir fosfato cálcico es el preferido.

Incorporar fosfatasa alcalina, la enzima encargada de la mineralización de los huesos, es una buena estrategia. La fosfatasa alcalina produce un aumento de la velocidad de gelificación e hidroliza el glicerolfosfato. El fosfato producido neutraliza los grupos amino (NH_3^+), enmascarando la repulsión entre cadenas de quitosano. A su vez, el glicerol promueve interacciones hidrófobas al deshidratar las cadenas de quitosano. ^[9]

5.5.5 Aplicaciones en la administración de fármacos, moléculas bioactivas y células

Las aplicaciones de los hidrogeles de CS-GP están limitadas por su baja fuerza mecánica, su rápida degradación, su baja estabilidad in vivo y una baja difusión de oxígeno. Por eso mismo, se han estudiado múltiples modificaciones y combinaciones, como son las ya descritas. ^[9]

Un ejemplo concreto es el de los hidrogeles para el transporte y liberación de BMP-2, una proteína morfogénica ósea, es decir un factor de crecimiento involucrado en la formación de hueso nuevo y cartílago. Interviene en la diferenciación de los osteoblastos en distintos tipos celulares. Se ha demostrado que los hidrogeles de quitosano con glicerolfosfato se pueden usar como sistema de administración y liberación de BMP-2. La combinación con nanopartículas de hidroxiapatita se usa para la liberación controlada de BMP-2. Otra opción para incluir BMP-2 en el hidrogel es la formación de microesferas de alginato. La BMP-2 es añadida justo antes de la gelificación, previamente encapsulada en microesferas de alginato que se adicionan al hidrogel. Estas microesferas no influyen en la capacidad de gelificación del hidrogel, pero si producen una mayor densidad y elevado número de enlaces de hidrógeno entre las microesferas y el cloruro cálcico. En cuanto a la liberación se produce un primer pico seguido de una liberación gradual, habiéndose liberado el 37% en el primer día y el 50% en el séptimo. En este tipo de geles la liberación se mantiene durante unas cuatro semanas. ^[9]

El hecho de que los hidrogeles sean inyectables evita que haya que realizar múltiples operaciones y por lo tanto, se reduce la probabilidad de una infección. A pesar de que las intervenciones quirúrgicas se realizan en condiciones asépticas, existe la posibilidad de contaminación e infección del tejido, complicando el tratamiento y la integración del implante. Los hidrogeles evitan estos problemas y añaden sus propiedades osteoinductivas y la capacidad de actuar como depósitos de antibióticos de liberación sostenida. Es el caso de los hidrogeles de CS/GP con gentamicina, que han demostrado su eficacia contra *E. coli*. ^[9]

Otro caso en el que los hidrogeles suponen una vía de administración adecuada es para el uso de alendronato. Es un inhibidor de la resorción ósea que se está indicado en un gran número de patologías óseas como la osteoporosis postmenopáusicas. Tiene baja biodisponibilidad oral y produce complicaciones por esta vía como necrosis en la mandíbula o irritación del esófago. Por vía intravenosa y transdérmica también produce problemas, por lo que la opción de aplicarlo incluido en hidrogeles de CS/GP resulta de gran interés. Estos hidrogeles actúan como formas de depósito del alendronato que va siendo liberado poco a poco. El tiempo de gelificación tras su administración es de unos quince minutos por lo que se reduce la aparición de efectos indeseados y la respuesta inflamatoria. La liberación puede durar hasta más de sesenta días, por lo que se mejora la adherencia de los pacientes al tratamiento ya que reducen el número de administraciones. ^[9]

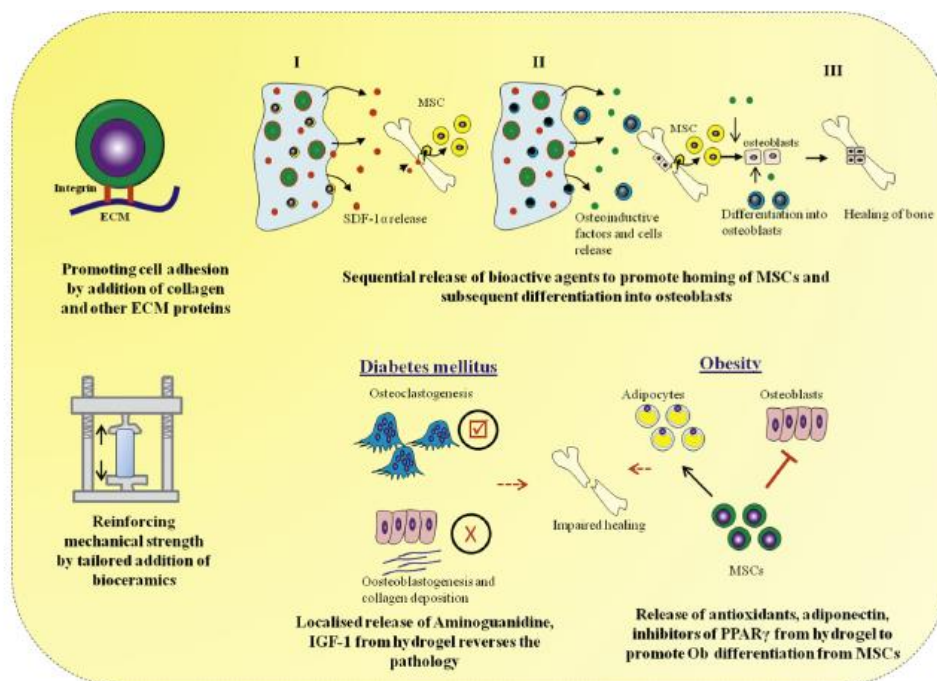


Fig 7. Representación esquemática de las futuras perspectivas en el desarrollo de hidrogeles de quitosano con β -glicerolfosfato. [9]

5.6 Hidrogeles de alginato con poliaminoamida

La carga superficial de un biomaterial tiene determinados efectos en el comportamiento celular. Con el fin de analizar dicho efecto, se han desarrollado hidrogeles que contienen alginato conjugado con poliaminoamida. Se comprobó que hay un impacto potencial en la diferenciación de células madre mesenquimales hacia adipocitos y osteoblastos. [14]

Las membranas celulares están cargadas negativamente por la presencia de proteínas, fosfolípidos y polisacáridos conjugados. Por ello, la carga idónea para el contacto con la matriz extracelular es positiva, dado que las cargas opuestas se atraen. En cuanto a los efectos observados, se concluyó que cuanto mayor es la carga superficial hay un incremento en la unión a las células y que las cargas positivas favorecen la diferenciación celular. [14]

El alginato es un polisacárido que se extrae de la pared celular de las algas pardas. [13] Se solubiliza lentamente en agua y forma soluciones coloidales viscosas. Gracias a la unión selectiva a iones, tiene la capacidad de gelificar. [15] Presenta biocompatibilidad, baja toxicidad, propiedades mecánicas y porosas ajustables. Su superficie está cargada negativamente, pero mediante modificaciones se mejora su adhesión celular. [14]

En la fabricación de hidrogeles de alginato se pueden usar dímeros de poliaminoamida (PAMAM) con cargas altamente positivas que se unan a los andamios de alginato. Una vez unidos, la carga superficial pasa de ser negativa a positiva debido a la elevada cantidad de grupos amino que hay en cada molécula de PAMAM que se protonan en solución acuosa. [14] Los grupos amino han demostrado tener una mejor adhesión celular que otros grupos, como carboxilo, metilo e hidroxilo. [16] La unión entre el alginato y los dímeros de PAMAM se produce por la formación de

enlaces peptídicos. Se ha visto además, que a altas concentraciones de PAMAM no sólo se produce una unión al alginato sino que se forma una multicapa. [14]

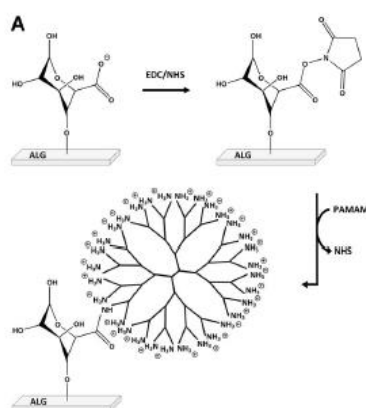


Fig 8. Conjugación de la poliaminoamida al alginato y formación de la multicapa[14]

Como ya se ha comentado, se producen una serie de cambios en la superficie del hidrogel. La carga pasa de ser negativa, debido a los grupos carboxilo del alginato, a positiva por los grupos amino de la poliaminoamida. De este modo, las proteínas séricas se adsorben a la superficie atraídas por la carga positiva. [14]

Si ya de por sí la superficie del alginato es hidrofílica, al conjugarlo con PAMAM se aumenta dicha propiedad, independientemente de la concentración utilizada. Además, la superficie del hidrogel no modificado de alginato presenta poros de unos 70nm, mientras que con la adición de PAMAM se reduce esta rugosidad logrando superficies lisas a altas concentraciones. [14]

Cubrir la superficie del material con proteínas conlleva una equiparación de la carga superficial y su humectabilidad, por lo que las células interaccionan mejor con esas proteínas que con otros componentes de la superficie. Sin embargo, la unión de proteínas no altera en ningún caso la rugosidad. [14]

Aunque se ha visto que hay unión de proteínas a los hidrogeles de alginato sin modificar, se producen importantes cambios estructurales en ellas y se desnaturalizan. Al añadir poliaminoamida se consigue reducir estas alteraciones y se mejora la unión a las proteínas, consiguiendo la diseminación de células mesenquimales con una sobreexpresión de integrina 5 α y tensina 1. [14]

Por otro lado, cabe destacar el efecto citotóxico de la poliaminoamida a muy altas concentraciones, cuando se forma la multicapa, produciendo un descenso de la capacidad de propagación celular y de la viabilidad de las células mesenquimales. Al haber grandes concentraciones de PAMAM, las proteínas alteran su estructura para adherirse y pierden parte de la capacidad para interaccionar con otras células. La citotoxicidad se reduce cuando se encuentra fijada a la superficie. [14]

Actualmente se están estudiando distintas concentraciones de poliaminoamida en hidrogeles de alginato para analizar la unión a proteínas y el comportamiento de las células mesenquimales.

Se ha demostrado que para el cultivo de células madre mesenquimales, una carga positiva tiene efectos osteogénicos y adipogénicos, además de suprimir genes asociados a la condrogénesis. Por ello, se está investigando los hidrogeles de alginato con poliaminoamida conjugada en el desarrollo de implantes biomédicos que influyan directamente sobre el comportamiento de las células madre mesenquimales. ^[14]

6. CONCLUSIÓN

Los hidrogeles constituyen una nueva terapia en el tratamiento de las enfermedades óseas. Como ya se ha explicado presentan importantes ventajas frente a los tratamientos tradicionales, ya que son poco invasivos, se inyectan, y al entrecruzarse directamente en la zona de la lesión no están condicionados por la forma del defecto. Además, promueven la adhesión y proliferación celular y facilitan una organización tridimensional adecuada del nuevo tejido, lo más similar posible al hueso humano. Sin embargo, también tienen algunos inconvenientes, pues pueden presentar cierta toxicidad y tienen una fuerza mecánica inferior a la de los soportes prefabricados, tanto orgánicos como inorgánicos.

Desde hace unos años se está trabajando en la combinación de materiales bioactivos con polímeros biodegradables que mejoren sus propiedades biológicas y mecánicas. Se busca de este modo aumentar al máximo su potencial regenerativo óseo y minimizar los problemas y desventajas encontrados hasta el momento.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Mostafa Mahinroosta, Zohreh Jomeh Farsangi, Ali Allahverdi, Zahra Shakoori. Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. *Materials Today Chemistry*. 2018;8:42-55.
2. Xin Bai, Mingzhu Gao, Sahla Syed, Jerry Zhuang, Xiaoyang Xu, Xue-Qing Zhang. Bioactive hydrogels for bone regeneration. *Bioactive Materials*. 2018;3:401-4017.
3. Susana Quintanilla Cavia. Aplicaciones de células madre mesenquimales (MSCs) en la reparación y regeneración del tejido óseo. Trabajo Fin de Grado, Grado en Medicina. Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria. 2017.
4. Ramanathan Yegappan, Vignesh Selvaprithiviraj, Sivashanmugam Amirthalingam, R. Jayakumar. Carrageenan based hydrogels for drug delivery, tissue engineering and wound healing. *Carbohydrate Polymers*. 2018;198:385-400.
5. Andrea Pacifici, Luigi Laino, Marco Gargari, Federico Guzzo, Andrea Velandia Luz, Antonella Polimeni, Luciano Pacifici. Decellularized Hydrogels in Bone Tissue Engineering: A Topical Review. *International Journal of Medical Sciences*. 2018; 15: 492-497

6. Sergio Pineda-Castillo, Andrés Bernal-Ballén, Cristian Bernal-López, Hugo Segura-Puello, Diana Nieto-Mosquera, Anrea Villamil-Ballesteros, Diana Muñoz-Forero, Lukas Munster. Synthesis and Characterization of Poly(Vinyl Alcohol)-Chitosa-Hydroxyapatite Scaffolds: A Promising Alternative for Bone Tissue Regeneration. *Molecules*. 2018; 23(10) 2414.
7. Jorge A. del Campo Cano. Regeneración ósea en ratas atómicas mediante el empleo de células madre mesenquimales adiposas humanas diferenciadas in vitro a osteoblastos sobre scaffolds de suero humano y glutaraldehído. Tesis doctoral. Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas. Universidad de Oviedo. 2017
8. Padilla Quintero, Beatriz et al. Preparación y caracterización de geles conductores a base de quitosano para posibles aplicaciones biomédicas. *Revista de Ciencias*, [S.l.], v. 21, n. 1, p. 91-99, abr. 2018
9. Sekaran Saravanan, Selvaraj Vimalraj, Palanisamy Thanikaivelan, Sivanantham Banudevi, Geetha Manivasagam. A review on injectable chitosan/beta glycerophosphate hydrogels for bone tissue regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;121:38-54.
10. S. Saravanan et al./ *International Journal of Biological Macromolecules* 121 (2019) 38-54
11. Jesús Eduardo López López, Jorge Alfonso Tavares Negrete, Irais Amaranta Quintero Ortega. Extracción y purificación de colágeno de tipo I para aplicaciones en ingeniería de tejidos. *Jóvenes en la Ciencia*; vol. 4, núm. 1. 2018
12. J Alvarez-Barreto, K Márquez, E Gallardo, J. Moret, N. Benítez, M. Meyer, S. Marsiccobetre, D. Zujur. Cultivo de Células Madre Mesenquimales Sobre Hidrogeles Compuestos de Nanopartículas de Hidroxiapatita y Quitosano Foto-Entrecruzable. *Revista mexicana de ingeniería biomédica*. 2017; vol.38: no.3
13. Fazli Wahid, Ya-Ning Zhou, Hai-Song Wang, Tong Wan, Cheng Zhong, Li-Qiang Chu. Injectable self-healing carboxymethyl chitosan-zinc supramolecular hydrogels and their antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 2018 Jul 15; 114: 1233-1239.
14. André Schulz, Alisa Katsen-Globa1, Esther J. Huber, Sabine C. Mueller, Asger Kreiner, Norbert Pütz, Michael M. Gepp, Benjamin Fischer, Frank Stracke, Hagen von Briesen1, Julia C. Neubauer1, Heiko Zimmermann. Poly(amidoamine)-alginate hydrogels: directing the behavior of mesenchymal stem cells with charged hydrogel surfaces. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2018; 29:105
15. Pablo Bonilla Valladares. Formación y caracterización de nanosistemas terapéuticos de alginato. *Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació*. Universitat de Barcelona. 2016.

16. Dhowre HS., Rajput S., Russell NA., Zelzer M. Responsive cellmaterial interfaces. *Nanomedicine*. 2015;10:849-71.